

(19)日本国特許庁 (J P)

(12) 公表特許公報 (A)

(11)特許出願公表番号

特表平8-506182

(43)公表日 平成8年(1996)7月2日

(51)Int.Cl. <sup>6</sup> G 0 1 N 33/538 27/447 33/532	識別記号 A	庁内整理番号 8310-2J 7363-2J	F I  G 0 1 N 27/26 3 3 1 Z
審査請求 未請求 予備審査請求 有 (全 30 頁)			
(21)出願番号 (86)(22)出願日 (85)翻訳文提出日 (86)国際出願番号 (87)国際公開番号 (87)国際公開日 (31)優先権主張番号 (32)優先日 (33)優先権主張国 (81)指定国	特願平6-517085 平成6年(1994)1月12日 平成7年(1995)7月24日 PCT/US94/00426 WO94/17409 平成6年(1994)8月4日 006,922 1993年1月22日 米国(US) EP(AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IE, IT, LU, M C, NL, PT, SE), AU, JP		
(71)出願人 (72)発明者 (72)発明者 (74)代理人	ノースイースタン ユニバーシティ アメリカ合衆国 02115 マサチューセッ ツ州 ボストン ハンティングトン アベ ニュー 360 カルガー, バリー, エル. アメリカ合衆国 02159 マサチューセッ ツ州 ニュートン デボラ ロード 62 シムラ, キヨヒト アメリカ合衆国 02160 マサチューセッ ツ州 ニュートンヴィレ マンロー スト リート 7 弁理士 秋元 輝雄		

(54)【発明の名称】 親和結合毛細管電気泳動による微量分析物の定量

## (57)【要約】

サンプル中の微量の分析物の定量的検出方法が開示される。好ましい実施例における方法は、反応性スルフィドリル基において蛍光染料で標識された免疫グロブリンF a b' フラグメントを提供し；分析物を含む可能性があるサンプルと該標識F a b' フラグメントとを合わせ；得られた混合物の成分を電場で濃縮し；毛細管電気泳動によって、形成された標識分析物／作用物質複合体を一切の未反応標識作用物質から分離し；さらに標識分析物／作用物質複合体の蛍光信号を検出することを含む。本発明はまた、標識F a b' フラグメントの製造方法にも関するが、本方法は、免疫グロブリン分子を切断して1つのF (a b')<sub>2</sub>フラグメントを得て；該F (a b')<sub>2</sub>フラグメントのジスルフィド結合を還元し、各々が少なくとも1つの自由な反応性スルフィドリル基をもつ2つのF a b' フラグメントを得て；さらに、少なくとも1つの自由なスルフィドリル基をもつF a b' フラグメントを、自由なスルフィドリル基と反応する蛍光染料と混合し、標識F a b' フラグメントを生成することを含む。好ましくは、最終混合工程の前に、鎖内ジス

ルフィド結合が各F a b' フラグメント内で酸化によって形成され、これによって、個々のF a b' フラグメントがそれぞれ唯1つの反応性スルフィドリル基をもつF a b' フラグメントが製造される。この定量的検出方法はまた、より広範囲に標的分析物と複合体を形成するいずれの生物学的特異的作用物質の使用も含む。

**【特許請求の範囲】**

1. 反応性スルフヒドリルにおいて検出可能なレポーター基で標識された免疫グロブリン F a b' フラグメントであって、当該分析物に結合し分析物-F a b' フラグメント複合体を形成できる当該 F a b' フラグメントを提供し；  
当該標識 F a b' フラグメントを当該分析物を含む可能性があるサンプルと混合物中で組み合わせ；  
毛細管電気泳動によって当該混合物の成分を分離し；さらに；  
当該サンプル中の当該分析物の存在の表示として、当該分析物-F a b' 複合体上の当該レポーター基を検出するという工程を含むサンプル中の微量分析物の定量的検出方法。
2. さらに、電場で当該混合物の成分を濃縮する工程を含む、請求の範囲第 1 項の方法。
3. 当該レポーター基が、フルオロフォア、UV もしくは可視クロモフォア、放射性同位元素、スピン標識、電気化学的レポーター、化学発光レポーターおよび酵素から成る群から選ばれる、請求の範囲第 1 項の方法。
4. 当該レポーター基が蛍光染料である請求の範囲第 1 項の方法。
5. 当該レポーター基が、実施 pH 範囲内の pH 変化に感受性をもたない、請求の範囲第 1 項の方法。
6. 当該検出可能なレポーター基がシアニンまたは他の近赤外部励起染料である、請求の範囲第 1 項の方法。
7. 当該検出工程がレーザー誘発蛍光による請求の範囲第 1 項の方法。
8. 当該濃縮工程および当該分離工程が同時に実施される、請求の範囲第 1 項の方法。
9. 当該濃縮工程がイソタコフォレーシスを含む請求の範囲第 1 項の方法。
10. 当該分離工程が等電点集合を含む請求の範囲第 1 項の方法。
11. 当該分析物がペプチドまたは蛋白である請求の範囲第 1 項の方法。
12. 当該分析物が誘導派生ペプチドまたは蛋白である、請求の範囲第 1 項

の方法。

13. 免疫グロブリン分子を提供し；

当該免疫グロブリン分子をペプシンで切断し、2つのジスルフィド連結F a b' ユニットと当該免疫グロブリン分子のヒンジ領域から成る、当該免疫グロブリン分子のF (a b')<sub>2</sub>フラグメントを得て；さらに、

当該F (a b')<sub>2</sub>フラグメントのジスルフィド結合を還元し、各々が反応性スルフヒドリル基をもつ2つのF a b' フラグメントを得るという工程を含む、レポーター基で標識するための反応性スルフヒドリル基をもつ免疫グロブリンのF a b' フラグメント生成の方法。

14. 当該還元工程の後、酸化による鎖内ジスルフィド結合を再編成し、それによって個々のF a b' フラグメントがそれぞれただ1つの反応性スルフヒドリル基をもつF a b' フラグメントを調製する工程をさらに含む、請求の範囲第13項の方法。

15. 反応性スルフヒドリル基を有する免疫グロブリンのF a b' フラグメントを提供し；

当該F a b' フラグメントの当該反応性スルフヒドリル基と反応する部位を有する検出可能なレポーター基を提供し；

当該F a b' フラグメントおよび当該検出可能なレポーター基をともに混合して、当該F a b' フラグメントの当該反応性スルフヒドリルを当該検出可能なレポーター基の当該反応性部位と反応させ標識F a b' フラグメントを生成するという工程を含む、免疫グロブリンの標識F a b' フラグメントを製造する方法。

16. 当該検出可能なレポーター基の当該反応性部位が置換反応を受ける、請求の範囲第15項の方法。

17. 当該検出可能なレポーター基の当該反応性部位がハロアセチル誘導体である、請求の範囲第15項の方法。

18. 当該分析物を含む可能性があるサンプルと、当該分析物に結合して分析物-F a b' 複合体を形成することができる、反応性スルフヒドリル基におい

て検出可能なレポーター基で標識された標識F a b' フラグメントをとともに混合し；

等電点集合によって当該混合物の成分を濃縮し分離し；さらに、

当該サンプル中の当該分析物の量の表示として、当該分析物－F a b' 複合体上の当該レポーター基を定量的に検出するという工程を含むサンプル中の微量の分析物を定量的に検出する方法。

19. 当該検出可能なレポーター基が蛍光染料である、請求の範囲第18項の方法。

20. 当該検出可能なレポーター基が、実施のpH範囲内のpH変化に感受性をもたない、請求の範囲第18項の方法。

21. 当該分析物を含む可能性があるサンプルと、当該分析物と結合することができる生物学的特異的作用物質とをとともに混合して、検出可能なレポーター基を含む分析物－作用物質複合体を形成し；

電場で当該混合物の成分を濃縮し；

電気泳動によって当該混合物の成分を分離し；さらに、

当該サンプル中の当該分析物の量の表示として、当該分析物－作用物質複合体上の当該レポーター基を定量的に検出するという工程を含む、サンプル中の微量分析物を定量的に検出する方法。

22. 当該生物学的特異的作用物質が当該検出可能なレポーター基で標識される、請求の範囲第21項の方法。

23. 当該混合工程において、当該検出可能なレポーター基を含む既知量の当該標識分析物をさらに混合することを含む、請求の範囲第21項の方法。

24. 当該生物学的特異的作用物質が、抗体フラグメント、結合蛋白、およびリガンドから成る群から選ばれる、請求の範囲第21項の方法。

25. 当該レポーター基が、フルオロフォア、UVもしくは可視クロモフォア、放射性同位元素、スピン標識、電気化学的レポーター、化学発光レポーターおよび酵素から成る群から選ばれる、請求の範囲第21項の方法。

26. 当該濃縮工程と当該分離工程が同時に実施される、請求の範囲第21

項の方法。

27. 当該濃縮工程がイソタコフォレーシスを含む請求の範囲第21項の方法。

28. 当該分離工程が等電点集合を含む、請求の範囲第21項の方法。

**【発明の詳細な説明】**

名称 親和結合毛細管電気泳動による微量分析物の定量

発明の分野

本発明は、サンプル中の微量分析物の定量的検出方法に関する。より具体的には、本発明は、微量分析物の標識複合体の形成および毛細管電気泳動によるその分析に関する。

政府の権利

本発明をもたらした研究の一部は合衆国政府の基金で行われ、したがって、合衆国政府は本発明に関して一定の権利を有する。

発明の背景

サンプル中の微量物質 ( $< 10^{-8} - 10^{-9}M$ ) の定量分析には鋭敏で特異的な検出方法が要求される。そうでなければ、サンプル中の微量物質の同定は、より高濃度で見出される物質によって覆い隠される。微量物質の直接測定は、分析物の低い濃度のために少量のサンプルではしばしば困難である。この問題は、対象となる物質が、容易に測定することができる物理的または化学的特性（例えばUV吸収性）をもたない場合にその度合いを増す。分析物への放射性同位元素標識の導入は鋭敏な検出方法を提供するが、大量の放射性廃棄物の廃棄は費用が嵩む。

標的微量物質に対する抗体を用いる免疫化学的検出は、サンプル中の微量複合物を同定する最も特異的な方法の1つを提供する。免疫プロット法およびELISA法では、添加基質の検出可能な着色または蛍光生成物への変換を触媒する酵素に結合させた抗体が利用される。しかしながら、交差反応および非特異的結合によって正確さは減少し、さらにこれらの方法は多くの工程、高価な化学薬品および長い保温時間を必要とする。

マニアン (Manian) らの米国特許第5137609号は、蛍光的に標識した結合物質と特異的移動時間の測定を用いた、量が豊富な標的分析物のための電気泳動利用検出系を開示する。マニアンらは、遊離している結合物質が測定

場所に到達する時間を記録することによって装置に目盛りを付け、続いてこの時

間を用いて、複合体で予想される窓を設定する。さらに、蛍光標識からの記録信号のデータを調べ、遊離している結合物質と結合済の複合体との間の関係を確立する。

ニールセンら (Nielsenら、J. Chrom. 539:177-185 (1991)) は、形成された抗原／抗体複合物の溶液流通式毛細管ゾーン電気泳動による分離を開示する。抗原、抗体または複合物の UV 吸収を直接測定することによって、該複合体を検出、同定する。

### 発明の要旨

本発明は、サンプル中の微量の分析物 ( $< 10^{-8} - 10^{-9} \text{M}$ ) を定量的に検出するための分析方法に関する。この方法は、分析物と標識複合体を形成することができる生物学的特異性を有する作用物質を用い、さらに迅速で高い解析力を有する毛細管電気泳動分離術を用いて、標識前駆物質と作用物質／分析物複合体を濃縮、分離することによって実施される。

本発明の 1 つの特徴として、この方法は、生物学的特異的作用物質として、検出可能なレポーター基で反応性スルフヒドリル基部位で標識された免疫グロブリンの F a b' フラグメントを提供し；該分析物を含む可能性があるサンプルと該標識 F a b' フラグメントとを合わせ；さらに、毛細管電気泳動法を用いて、生じた標識物質／分析物複合体を一切の未反応標識物質から分離し；標識された分析物／作用物質複合体を検出することを含む。好ましい実施例では、F a b' フラグメントは単一のスルフヒドリル基において標識され、F a b' フラグメントを標識する当該レポーター基は、レーザー誘発蛍光の検出で使用するために蛍光染料であり、さらに該混合物の成分はまた電場で濃縮される。

本発明の別個の特徴として、反応性スルフヒドリルを有する免疫グロブリンの F a b' フラグメントは、レポーター基による標識のために蛋白分解酵素ペプシンで免疫グロブリン分子を切断して 1 個の F (a b')<sub>2</sub> フラグメント (ヒンジ領域プラス 2 個のジスルフィド結合ユニットと F c 部分の小ペプチドとから成る) を得ることによって製造される。続いてジスルフィド結合 F (a b')<sub>2</sub> を還元して 2 個の F a b' フラグメントが得られる。好ましくは、鎖内ジス

ルフィド結合は酸化によって形成され、各々が1個の反応性スルフヒドリル基をもつそれぞれのF a b' フラグメントが得られる。

標識F a b' フラグメントは、反応性スルフヒドリル基をもつ免疫グロブリンF a b' フラグメントを提供し；該F a b' フラグメントの反応性スルフヒドリル基と反応する1個の部位を有する検出可能なレポーター基を提供し、；さらに、該F a b' フラグメントと該検出可能なレポーター基とを混合し、それによってF a b' フラグメントの反応性スルフヒドリル基を該検出可能なレポーター基の反応性部位と反応させ、標識F a b' フラグメントを生成することによって調製できる。

図1のように、サンプル中の分析物と蛍光標識抗体フラグメント、または通常の生物学的特異的作用物質は、反応して複合体または”反応対”を形成するが、これは単独の標識物質とは物理的、化学的に異なる性状を有する。当該複合体のこれらの性状によって、未反応標識物質からの分離が可能になる。

好ましくは、本発明の分離方法は、濃縮と分離の工程の両方を含む。最も好ましくは、当該分離工程は、濃縮工程と組み合わせて実施され、等電点集合法 (isoelectric focusing technique) を用いて標識された生物学的特異的作用物質から分析物／作用物質複合体を濃縮、分離させる。また別には、濃縮工程は例えば微小毛細管でのイソタコフォレーシス (isotachopheresis) によって実施され、その後毛細管ゾーン電気泳動を用いて分離が実施される。電気泳動による分離は、例えばゲルマトリックスのような支持媒体中で実施でき、泳動緩衝液は付加的な物質を含むことができる。

他の特徴として、本発明は、本明細書および請求の範囲に記載したように他の生物学的特異的作用物質を幅広く含み、ここではそのような物質によって形成される反応対は、レセプター／リガンド、結合蛋白／リガンド、1本鎖もしくは2本鎖オリゴヌクレオチド、蛋白／オリゴヌクレオチド、レクチン／炭水化物および酵素／インヒビターを含むと定義されるが、但しこれらに限定されるものではない。本発明の方法において有用な他のレポーター基には、UVもしくは可視クロモフォア、放射性標識、酵素性レポーター基、リガンド、レセプター、スピン標識および電気化学的もしくは化学発光標識が含まれる。これらの基は



、複合体形成といずれかの適切な手段による分離の後検出できる。

一般には、遊離作用物質または分析物から生物学的特異的作用物質／分析物複合体を分離するために、本発明の方法は毛細管電気泳動を利用するので、どちらの反応性前駆物質をレポーター基で標識してもよく、生じた複合体を特異的かつ鋭敏に検出することができる。このような応用では、単クローン性抗体は、その均一性のゆえに結合親和性と電気泳動の移動度の両方で多クローン性抗体よりも適切である。完全な分子の代わりに単クローン性抗体のフラグメントを用いることによって、抗原との凝集が避けられる。生物学的特異的作用物質が反応対の標識部分である場合は、分析されるサンプルと標識作用物質とを混合し、適切な時間保温して、作用物質／分析物複合体を形成させる。生じた複合体が遊離の生物学的特異的作用物質の電気泳動移動度と異なる場合は、2種の標識存在物質は毛細管電気泳動によって分離され、標識複合体の量を特異的に検出できる。この系では、生物学的特異的標識作用物質は、迅速に反応対を形成させ、定量すべき分析物の量に対して直線的反応を得るために比較的高濃度で用いることができる。この系は、複合体形成に際して生物学的特異的標識作用物質の移動度を効果的に変化させることができる巨大分子分析物について適切である。

分析物が標識された前駆体種である場合には、分析されるサンプルを標識分析物および標識されていない生物学的特異的作用物質と混合する。保温後、毛細管電気泳動によって標識分析物から標識複合体を分離し、蛍光によって定量する。サンプル中の分析物は、該作用物質との結合において標識分析物と競合するので、該複合体と遊離標識分析物の間の蛍光シグナル分布は、したがってサンプル中の分析物の量の関数であるはずである。この系は、免疫複合体の形成時に生物学的特異的作用物質に対して移動度の十分な変化を引き起こすことができない低分子量の分析物に対して適切である。標識分析物の移動度は、該分析物を複合体から分離させるために十分な移動の違いを標識分析物がもつことができるように、イオン性構成成分によって制御できる。

本発明は、迅速性、使いやすさ、感度の良さ、標的分析物の高い解析性、および分離された分析物の同定に付加的工程が不要であるという利点を提供する。固有の構造を有する標的分子はそうでないものと区別することができる。

さらに、各アッセーに必要な少量のサンプルがごく少量の高価な試薬の使用を必要とし、エラーが発生した場合、またはサンプルが沈澱した場合には、毛細管カラムを迅速に洗浄し再使用することができる。

#### 図面の簡単な説明

本発明の他の特徴および利点は、以下の好ましい実施例の説明と下記に添付した図面とによって明らかとなろう：

図1は、本発明の方法の工程を表した図である；

図2は、マウス IgG1 単クローン性抗体の標識 Fab' フラグメントの調製を表した図である；

図3は、テトラメチルローダミンで標識した IgG1 Fab' フラグメントの想定される構造の1つを示す；

図4aは、テトラメチルローダミン標識 Fab' と 10 ng/ml の N-メチオニルヒト成長ホルモンとで得られた複合体の電気泳動図を示す；

図4bは、テトラメチルローダミン標識 Fab' と 1 ng/ml の N-メチオニルヒト成長ホルモンとで得られた複合体の電気泳動図を示す；

図5は、テトラメチルローダミン標識 Fab' で調べた、3種類のヒト成長ホルモン変種を含む人工的混合物の電気泳動図を示す；

図6aは、10倍希釈のヒト血清中で検出した、テトラメチルローダミン標識 Fab' と 50 ng/ml の N-メチオニルヒト成長ホルモンとで得られた複合体の電気泳動図を示す；

図6bは、N-メチオニル成長ホルモンを含まない10倍希釈のヒト血清によるブランク電気泳動図を示す；

図7は、N-メチオニルヒト成長ホルモンの定量的検出のための標準曲線のログーログ図表を示す；

図8は、結合作用物質／標的分析物の複合体形成の時間経過を示す。

#### 好ましい実施例の説明

毛細管電気泳動 (CE) は、混合物中の化合物を分析する鋭敏で迅速で正確な方法として最近認知され、微量分析の実施のために CE 技術の応用が特に重要となった。毛細管電気泳動は、ごく少量のサンプルを必要とし、分析は約

20分で完了する。毛細管電気泳動の高い解析力は、毛細管電気泳動を抗原-抗体複合体を含む複合体混合物の分析のための理想的な選択肢とさせた。

一般的抗体または免疫グロブリン分子は、該分子上の種々の部位に位置する種々の活性を有する。特異的な抗原結合活性は、重鎖の可変領域 ( $V_H$ ) に付随し、軽鎖の可変領域 ( $V_L$ ) ドメインはF a b フラグメントに位置し、一方、エフェクター機能 (例えば補体結合および細胞膜レセプター相互反応) は、通常F c フラグメントに付随している。免疫アッセーに免疫グロブリンのフラグメントを用いることは、他のドメインからの干渉を受けずに免疫グロブリンの1部分の活性を利用することを可能にする。

免疫グロブリン分子は、各々が別個の活性をもつフラグメントに選択的に切断することができる。パパインは、免疫グロブリン分子を2つのF a b フラグメントと鎖間のジスルフィド結合を含む1つのF c フラグメントに切断する。図2に示すように、対照的に、ペプシンによる切断は、1つのF (a b')<sub>2</sub> フラグメントとF c 部分の小さなペプチドを生じる。生じたF (a b')<sub>2</sub> フラグメントは、2つのジスルフィド結合で結合したF a b ユニットメントとヒンジ領域から成る。ジスルフィド結合F (a b')<sub>2</sub> フラグメントは還元され、2つのF a b' フラグメントを生じる。鎖内ジスルフィドの形成後、各々が1つの遊離チオール基をもつF a b' フラグメントが生じる。

ペプシン調製F a b' ユニットの1つの反応性チオール基は、外部のレポーター基または標識 (例えばフルオロフォア、クロモフォアまたは結合リガンド) を結合させるための有用な部位を提供する。F a b' の1つの反応性チオールは、ただ1つのレポーター基が各フラグメントに結合し、標識は特異であることを保証する。

蛍光レポーター基が本発明に用いられる場合は、実施が成功するように一定の性状が本発明については要求される。理想的には、結合フルオロフォアは、分析時に測定可能なシグナルを発生させるために強力な吸収と強い蛍光を有する必要がある。さらに、フルオロフォアは、検出方法実施時に著しい光退色性をもつべきではなく、さらに、分離方法として等電点集合を用いる場合には、実施pH領域ではpH非感受性でなければならない。pHに感受性のフルオロフォ

アは、pH勾配の中を移動している間にその量子効率（量子収量）が変化するので、等電点集合法では有用性が低い。したがって、本発明の好ましい方法で極めて重要なことは、蛍光標識の適切な選択である。好ましい蛍光標識基はテトラメチルローダミンヨードアセトアミドまたはシアニン染料である。

さらに、F a b' フラグメントへのレポーター基の結合は、活性部位または該分析物との結合反応に関与する他の領域から離れている必要がある。自己消光を最小限にするために、各F a b' フラグメントにただ1つの蛍光レポーター基を結合させることが好ましい。

続いて、適切な標識された過剰量のF a b' フラグメントを対象となる抗原を含むサンプルと混合する。大量の標識抗体フラグメントは、結合反応平行を複合体形成の方へと移動させ、したがって大半の抗原がタイプ分けされる。続いて、形成された複合体を電気泳動術によって濃縮し、未反応F a b' から分離する。電気泳動的濃縮および分離工程は、抗原-抗体フラグメント複合体の固有の物理的および化学的特性を利用する。濃縮工程は、遊離抗原および未反応標識フラグメントからの標識複合体のより完全な分離、並びに非常に少量の複合体のより強化された検出を可能にする。好ましくは、濃縮と分離工程は等電点集合によって同時に実施される。

等電点集合は、電場が与えられたとき、pH勾配を持つ媒体中の同じ領域に与えられた等電点（pI）をもつ全ての分子が移動する平衡過程である。好ましい実施例では、大半の抗原分子を標識フラグメントと反応させるために、過剰の標識F a b' を抗原と反応させる。未反応標識F a b' フラグメントは、反応複合体とは異なるpIを有し、この2種の分子種は、pH勾配において異なる点へと移動するであろう。

別の工程では、濃縮と分離は、フォーレットら（Foretら、J. Chromatogr. 608:3-12（1992）、この文献は参照により本明細書に含まれる）が記載したように毛細管ゾーン電気泳動と組み合わせてイソタコフォーレーシスによって連続的に実施できる。1例にしたがえば、オンカラム一過性イソタコフォーレーシス移動によって、比較的大量のサンプルをその後のCZEのために市販の器具に注入することが可能である。また別に、連結カラム系は、CZE泳動条件の選択に

においてより大きい自由度と、より大量のサンプル注入の可能性を与える。

本発明の方法を用いて同定できる抗原には、ホルモン、ペプチド、酵素、オリゴヌクレオチド、リガンド、レセプター、炭水化物、脂質およびハプテンが含まれる。問題の抗原の存在を分析することができるサンプルの種類には、血清、血漿、植物抽出物、細胞抽出物、細胞培養液、醗酵混合物、またはいずれかの複雑なサンプルが含まれる。

以下の実施例は、本発明の利点を詳述し、当業者が同じものを実施する場合に役立てるために提示する。これらの実施例は、如何なる意味においても本開示の範囲を制限するものではない。

### 実施例 I

好ましい実施例では、マウス単クローン性 IgG1 免疫グロブリン（ピアース（Pierce）；ロックフォード、イリノイ）をペプシンで切断し、得られた F（a b'）<sub>2</sub> フラグメントを分離し、還元剤（例えばジチオスレイトール、ジチオエリスリトールまたは  $\beta$ -メルカプトエチルアミン）で処理して3つの連結ジスルフィド結合を還元し、F a b' フラグメントを生成する。システイン残基間の鎖内ジスルフィド結合は、F a b' 分子につき唯1つの反応性チオール基を提供するために酸化によって形成する必要がある。各 F a b' フラグメントの遊離スルフヒドリル基は、テトラメチルローダミンヨードアセトアミド（モリキュラープローブ社；ユージーン、オレゴン）またはシアニン（ポリメチン鎖で連結された2つの4分化異種芳香族塩基から成る蛍光染料（Ernst. ら、Cytometry 10:3-10（1989）（この文献は参照により本明細書に含まれる））で標識される。このフラグメントを、例えばイモビリン（Imobiline）ゲル電気泳動（等電点集合）（ファルマシア）で使用前に精製する。標識 F a b' フラグメントの推定される構造を図3に示すが、そこでは、鎖内ジスルフィド結合は、イソロイシンによってのみ分断された2つのシステイン残基間で形成され、一方、残りのシステイン残基はその遊離スルフヒドリルを介して蛍光染料と反応させる。

N-メチオニル組換え体ヒト成長ホルモンのサンプル（ジェネンテック）を続いて過剰量の標識 F a b' フラグメントおよび担体アンホライトと混合し、さらにこの混合物をシリカ被覆融合毛細管カラムに導入する。標識 F a b'

フラグメントを過剰に供給し、それによって、抗原との反応をかなり短時間に完了させる。過剰の標識F a b' フラグメントの量は、複合体の予想される最大量の2から10倍以上となつてはならない。サンプルは場合によって夾雑物の混入の可能性を除去するために希釈またはろ過処理を行つてもよい。

抗原と標識抗体フラグメント間で形成される複合体は等電点集合法によつて分離されるが、この場合、分析物は、毛細管内に維持されているpH勾配内の位置にその等電点に基づいて移動する。シリカ毛細管はポリアクリルアミドで被覆され、その直径は5から200  $\mu\text{m}$ 、好ましくは25から100  $\mu\text{m}$ の範囲である。サンプルを担体アンホライトとともに混合し、適切な時間電氣的に集合させる。集合の後、分離した複合体を陽極液交換法(Hjertenら、米国特許第4725343号)によつて移動させ、レーザー誘発蛍光によつて検出する。蛍光分析における励起源としてレーザーを用いることによつて、多くの化合物の検出限界が著しく改善された(例えばピコモルの範囲またはそれ以下である:ヘムリア(Hemmila)、免疫アッセーにおける蛍光の利用 (Applications of Fluorescence in Immunoassays); (Chemical Analysis、117巻)、J. D. Winefordner著; Wiley-Interscience刊、ニューヨーク(1991)、この文献は参照により本明細書に含まれる)。また別に、分離された複合体と残存する抗体フラグメントは、オンライン画像化システム、例えばレーザー誘発蛍光を用いてその場で検出することができる。

図4 a および4 b は、2種の異なる濃度(10 ng/ml と1 ng/ml) でN-メチオニルヒト成長ホルモンで得られた電気泳動図を示している。成長ホルモン溶液(4  $\mu\text{l}$ )、標識F a b' フラグメント溶液(4  $\mu\text{l}$ ) および6%ファーマライト(Pharmalyte) 3-10 (4  $\mu\text{l}$ ) を混合し、毛細管(内径75  $\mu\text{m}$ 、長さ20 cm、ポリアクリルアミド被覆)に充填した。集合は、陽極液として20 mMのリン酸、陰極液として20 mMのNaOHを用いて8 kV、5分で実施した。毛細管の1部分(陽極から8 cm-18 cm)を氷冷水で冷却した。集合バンドを陽極液を20 mMのNaOHに変えることによつて陽極に移動させた。蛍光(580 nm)をレーザー励起(488 nm、2 mW)で陽極端から5 cmで検出した。図4 a によれば、10 ng/mlのサンプルの電気泳動

図は、比較的低い感度で2つの主要なピークを示している。より酸性領域にある15.2分のピークは複合体で、より塩基性領域(18.2分)は遊離標識フラグメントである。16.7分では、感度は標識フラグメントの完全なピークの検出より10倍低い。

図4bは、1 ng/mlのN-メチオニルヒト成長ホルモンの検出を示している。複合体は16.4分に出現し、標識Fab'は19.4分に出現する。挿入図は複合体ピークの拡大を示している。

### 実施例 I I

等電点が異なる抗原の変異体もまた本発明の方法によって分析できる。例えば、3種のヒト成長ホルモン種を含む人工的な蛋白混合物を調製した。1つのN-メチオニル成長ホルモンは、ヒト成長ホルモンのN末端にさらに1つのメチオニン残基を有する。N-メチオニル成長ホルモンのN149D変種は、アスパラギン酸によってアスパラギン-149ただ1つが置換されている。N149D/N152Dと呼ばれるもう1つの変種は、アスパラギン149および152が2つ一緒にアスパラギン酸によって置換されている。5  $\mu$  lの蛋白混合物(N-メチオニル成長ホルモン(31 ng/ml); N149D(59 ng/ml); およびN149D/N152D(113 ng/ml))を抗ヒト成長ホルモン単クローン性抗体のテトラメチルローダミン標識Fab'フラグメント5  $\mu$  l(700 ng/ml)と1%ポリアクリルアミド含有6%担体アンホライト(ファルマライト3-10)溶液に加え、サンプルを室温で5分保温した。ポリアクリルアミド被覆融合シリカ毛细管(内径75  $\mu$  m、長さ15 cm)にこの保温溶液を充填した。等電点集合を3 kVで1分、および6 kVで4分、陽極液としてリン酸、陰極液として20 mMのNaOHを用いて実施した。集合させた蛋白を、陽極液を0.1 M NaCl含有10 mMリン酸に変えることによって6 kVで陽極側に移動させた。レーザー励起(488 nm、2 mW)で、蛍光(580 nm)を陽極端から5 cmのところで検出した。これら密接に関連する変異種の得られた分離は図5に示すが、ここでは、ピーク1はN-メチオニル成長ホルモンで、ピーク2はN149Dで、ピーク3はN149D/N152Dである。

### 実施例 I I I

本発明の方法はまた、複雑な混合物中の特異的な分析物を検出するために用いることができる。図6 a および6 b に示したように、N-メチオニルヒト成長ホルモンとヒト血清の人工的混合物を、実施例 I I で述べた実験と同じ方法で分析した。図6 a は、10倍希釈のヒト血清中のメチオニル成長ホルモン（50 ng/ml）を示し、図6 b は、メチオニル成長ホルモンを含まない10倍希釈ヒト血清のブランク泳動を示している。図6 a では、標識メチオニル-GHのピークは血清のバックグラウンドに対して鮮明に検出できる。シアニン染料の使用は、その最大吸収が500 nmより大きいので、さらに一層バックグラウンドを減少させるであろう。したがって、レポーター基としてのそれらの検出は、血清成分の励起を誘発する可能性は低い。

#### 使用

直接親和結合毛細管電気泳動検出の並外れた特徴は、本発明の方法を、迅速な分析、高い感受性および使用の容易さが特に重要な場面で特に適切なものにする。例えば、臨床検査室では、単位時間当たり多数のサンプルを取り扱うことが可能で、さらに高度な訓練なしに技術者が実施できる工程が必要とされている。同様に、商業用の調製用工程を支援しさらにモニターするための工程進行の分析は、薬物速度論のための測定において代謝研究を支援するために分析が必要とされるように、定量的分析のための効率的で有効な技術によって利益を受けるであろう。

本発明の方法において可能な定量能力と迅速性は図7 および図8 に表されている。図7 に示すように、N-メチオニルヒト成長ホルモンの定量的検出のためのログ-ログ図表の標準曲線は、少なくとも1000倍の濃度範囲に亘って直線的であり、サンプル濃度の決定は広範囲に許容される。複合体形成の時間経過を表す図8 は、親和結合反応は、迅速な分離とともに5分以下で完了することを示し、このことは、本発明の方法は日常的に使用する場合に十分使用に耐える範囲内にあることを示すものである。

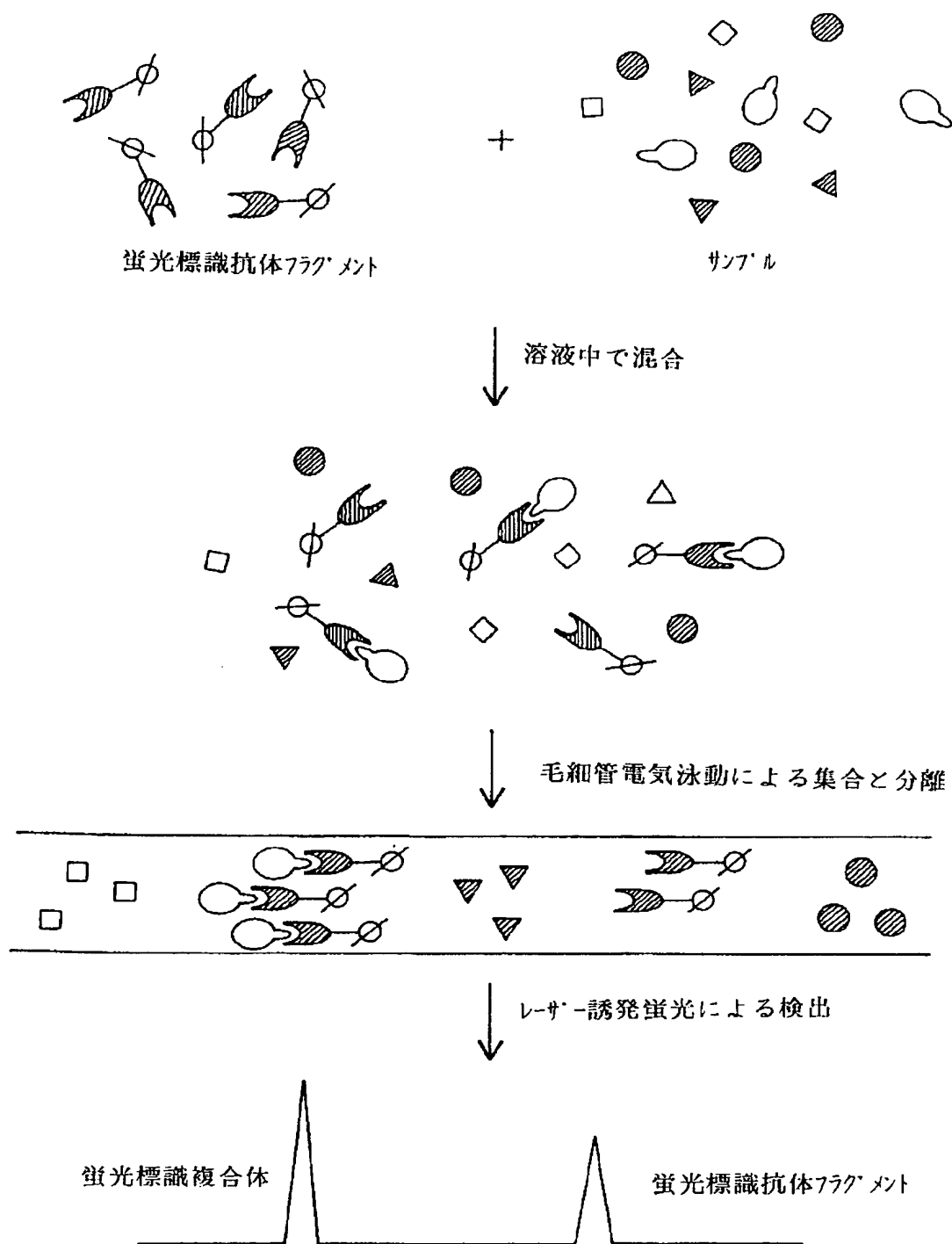
多数のサンプルを同時に扱う場合、蛍光結合毛細管電気泳動（FACE）を用いる好ましい系は、直線的に配置され、多数のサンプルを同時に処理で



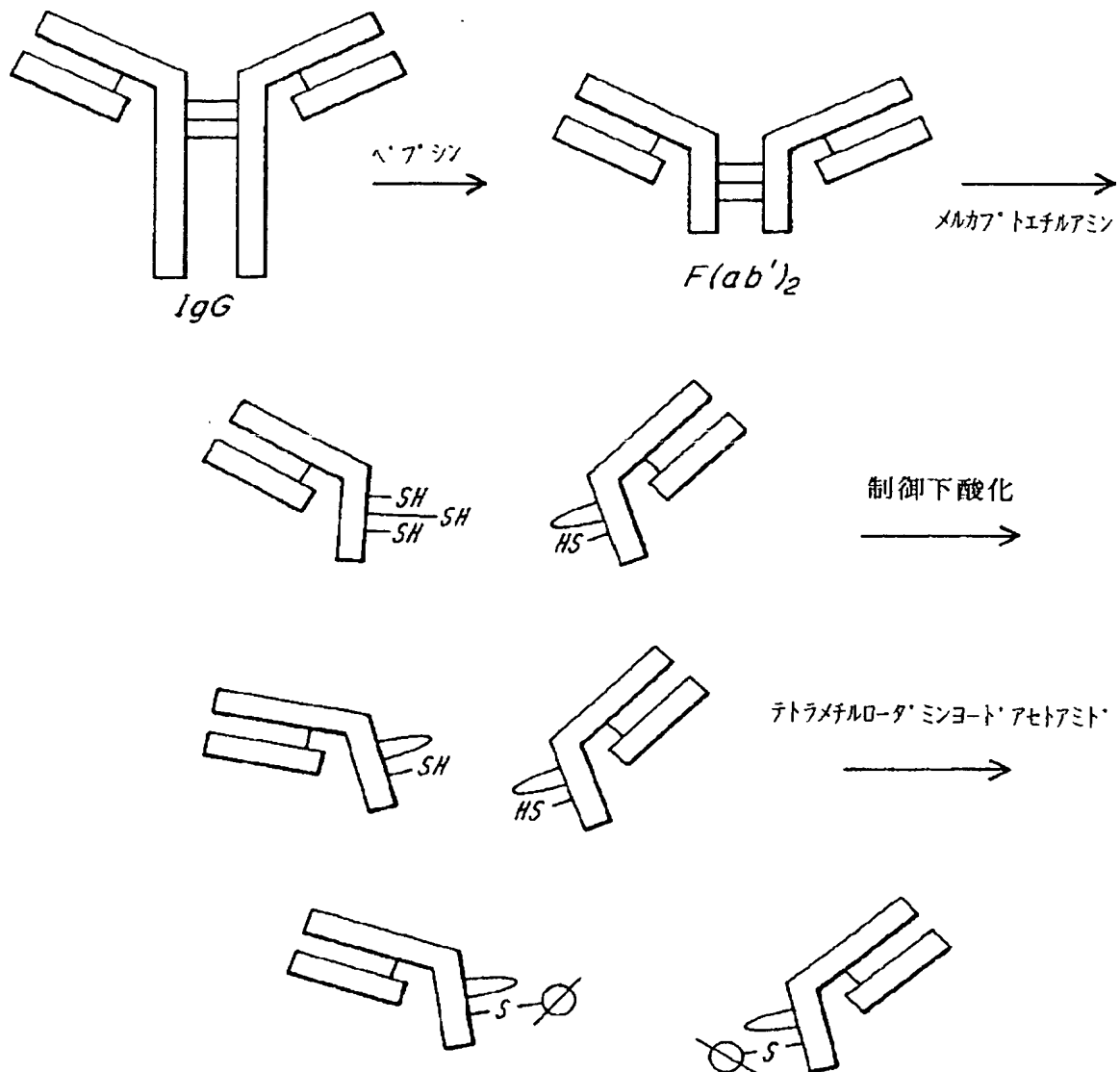
きる微小毛細管セットから成るであろう。標識抗体フラグメント／標的分析物複合体を等電点電気泳動によって未反応前駆体から分離した後、毛細管をレーザー誘発蛍光で直接走査し、同時に画像化できるであろう。サンプル評価は、リアルタイムで電氣的に記録されるか、またはそれに続いて移動させない集合状態でのデータ分析が記録されるであろう。分析完了後、毛細管内の緩衝液を吹き出し、僅かな遅れだけで新たな泳動を開始させることができる。この分析系は、自動化によって容易に連続工程化できる。

本発明を好ましい実施例と合わせて詳述したので、前述の記載によって、当業者ならば、種々の変更、同等物による置き換え、さらに前述の組成物および方法に対するその他の変更を実施することが可能であろう。したがって、レターズパテントによって付与される保護は、添付の請求の範囲に含まれる範囲およびその同等物によってのみ限定されるであろう。

【図1】

**FIG. 1**

【図2】

**FIG. 2**

【図 3】

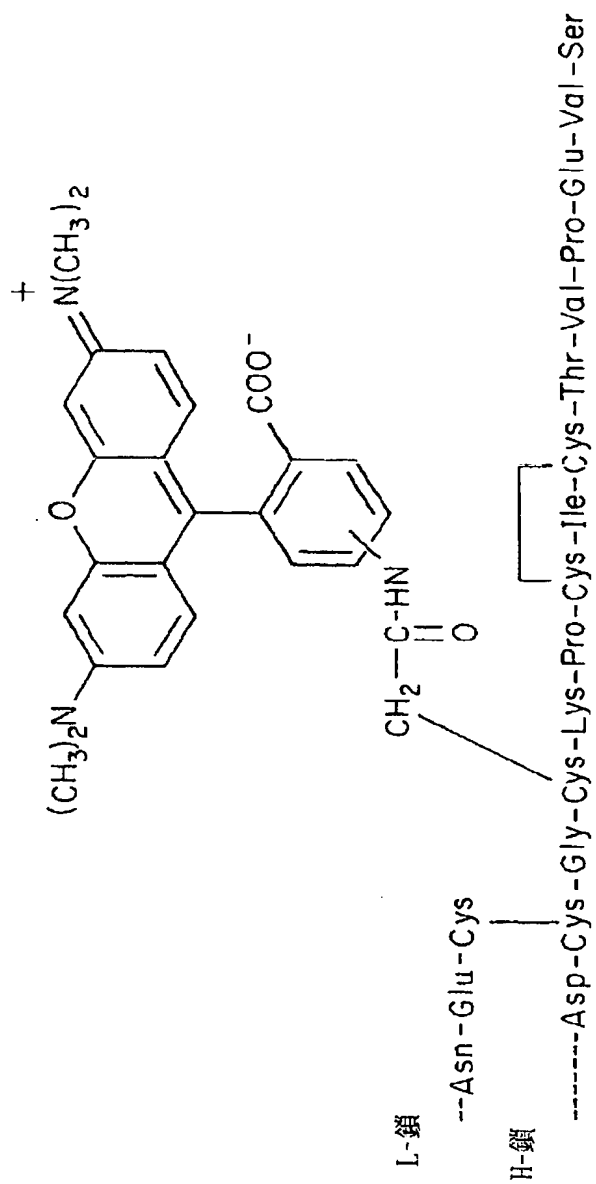
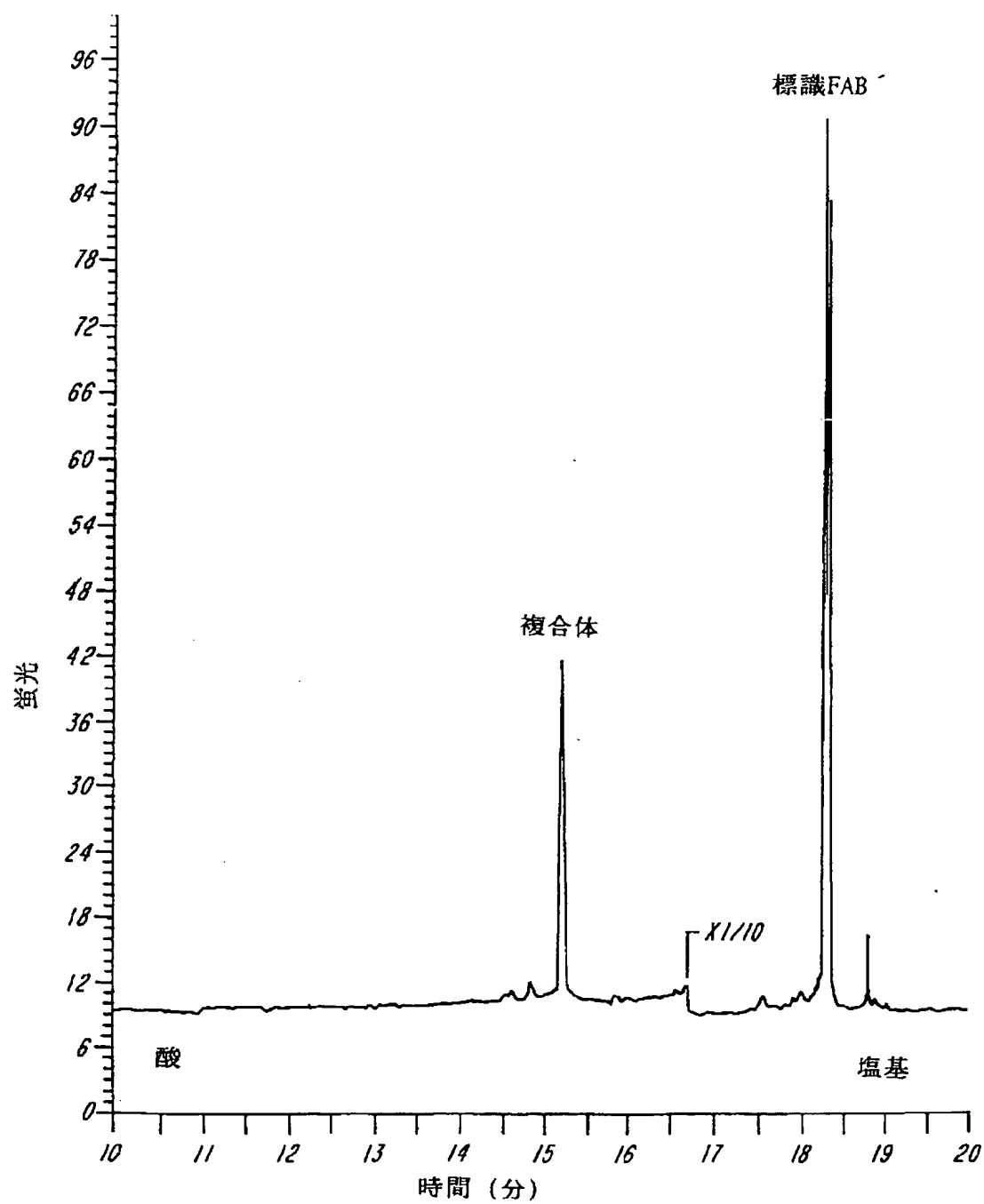
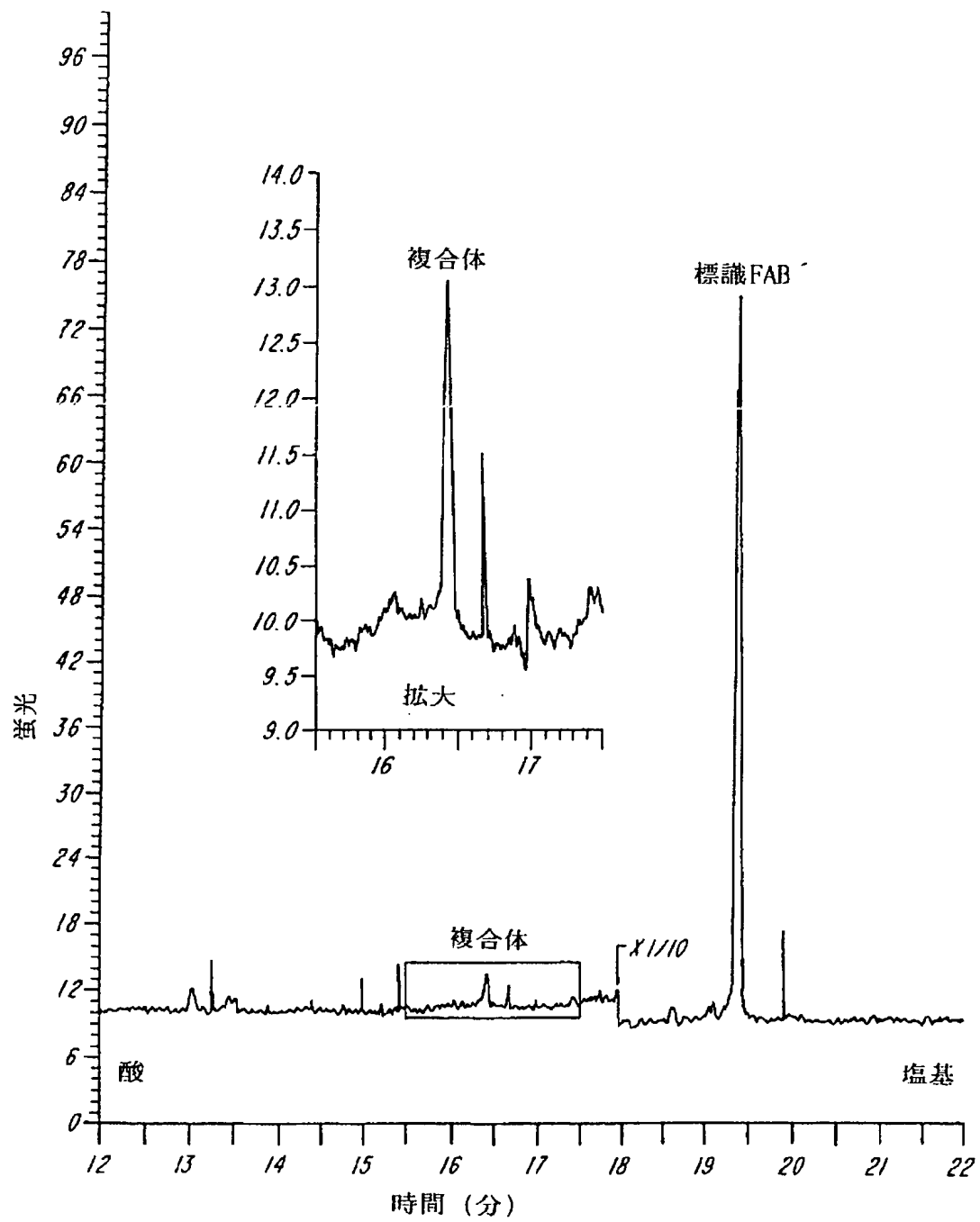


FIG. 3

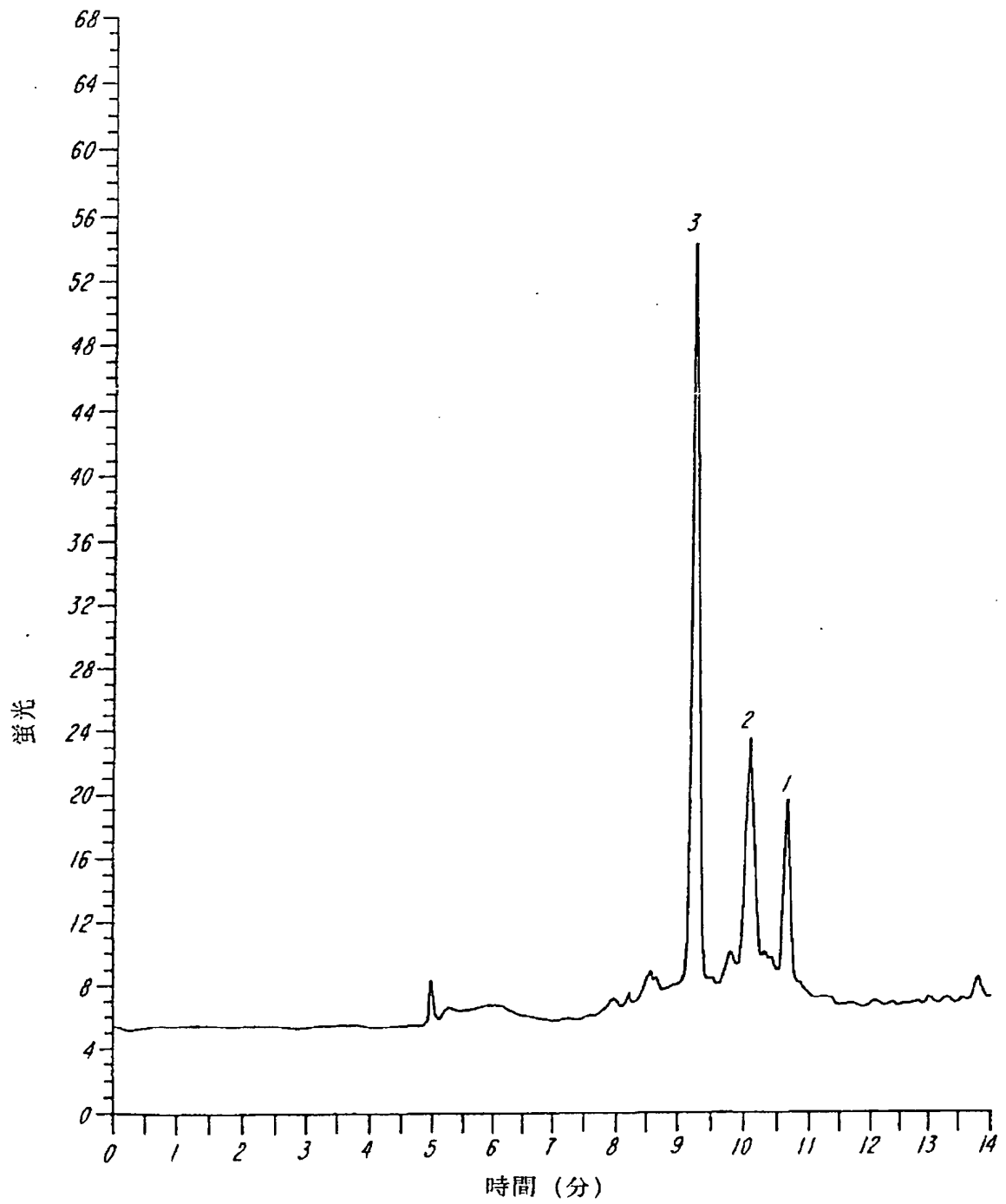
【図4A】

**FIG. 4A**

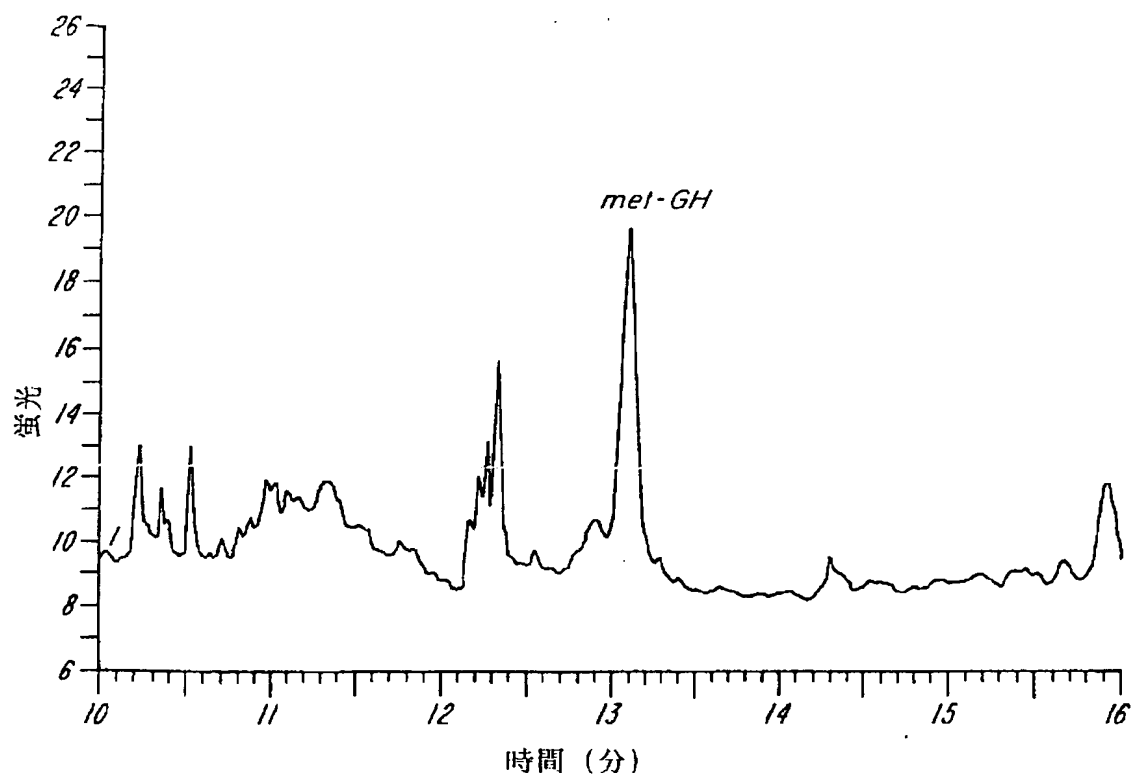
【図4B】

**FIG. 4B**

【図5】

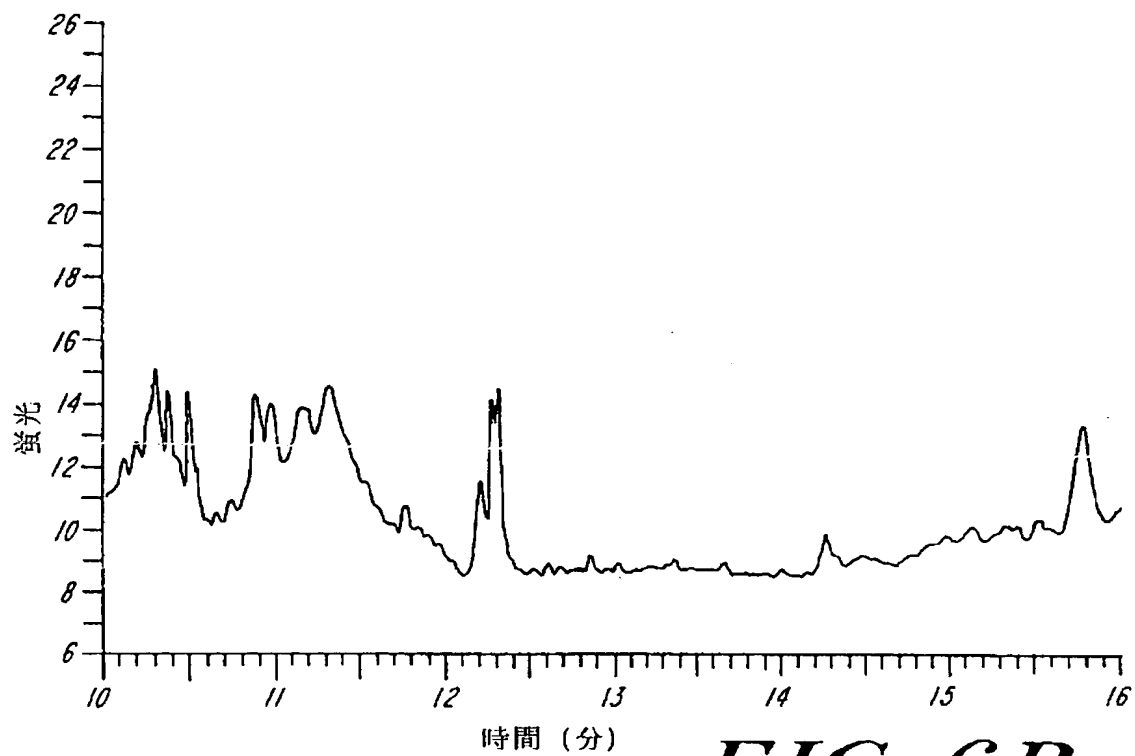
**FIG. 5**

【図 6 A】

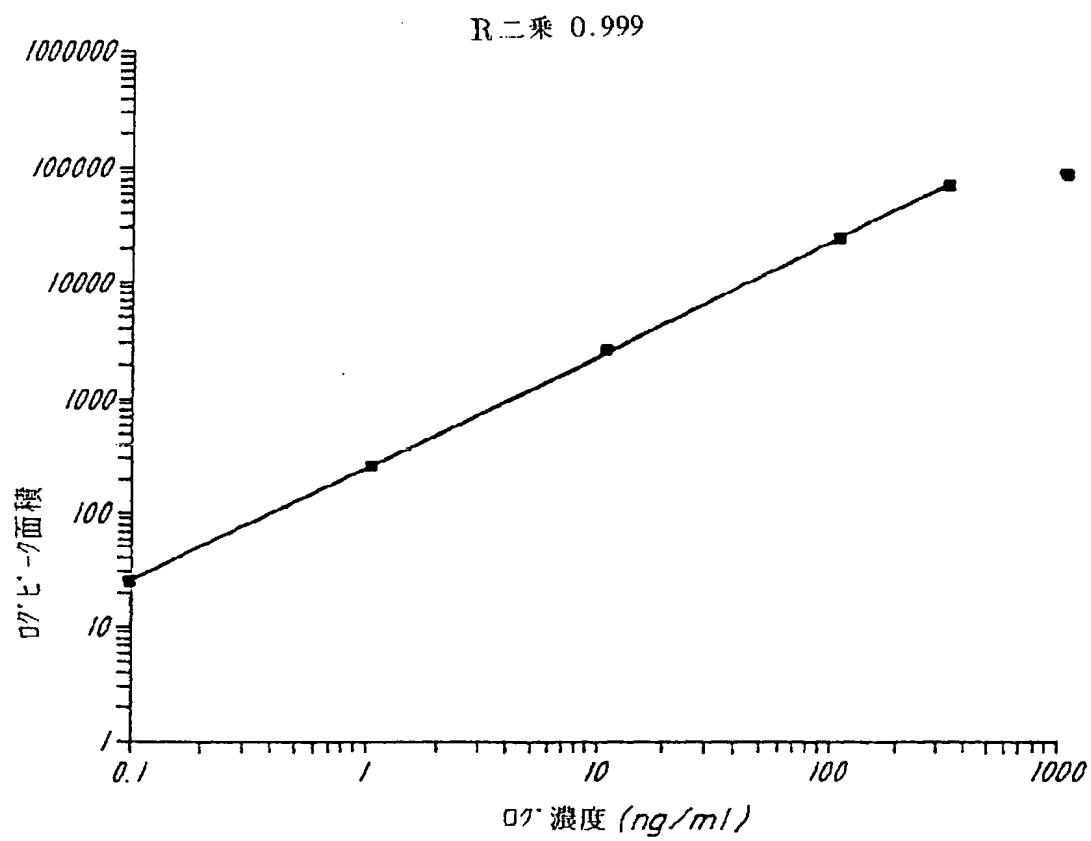
**FIG. 6A**

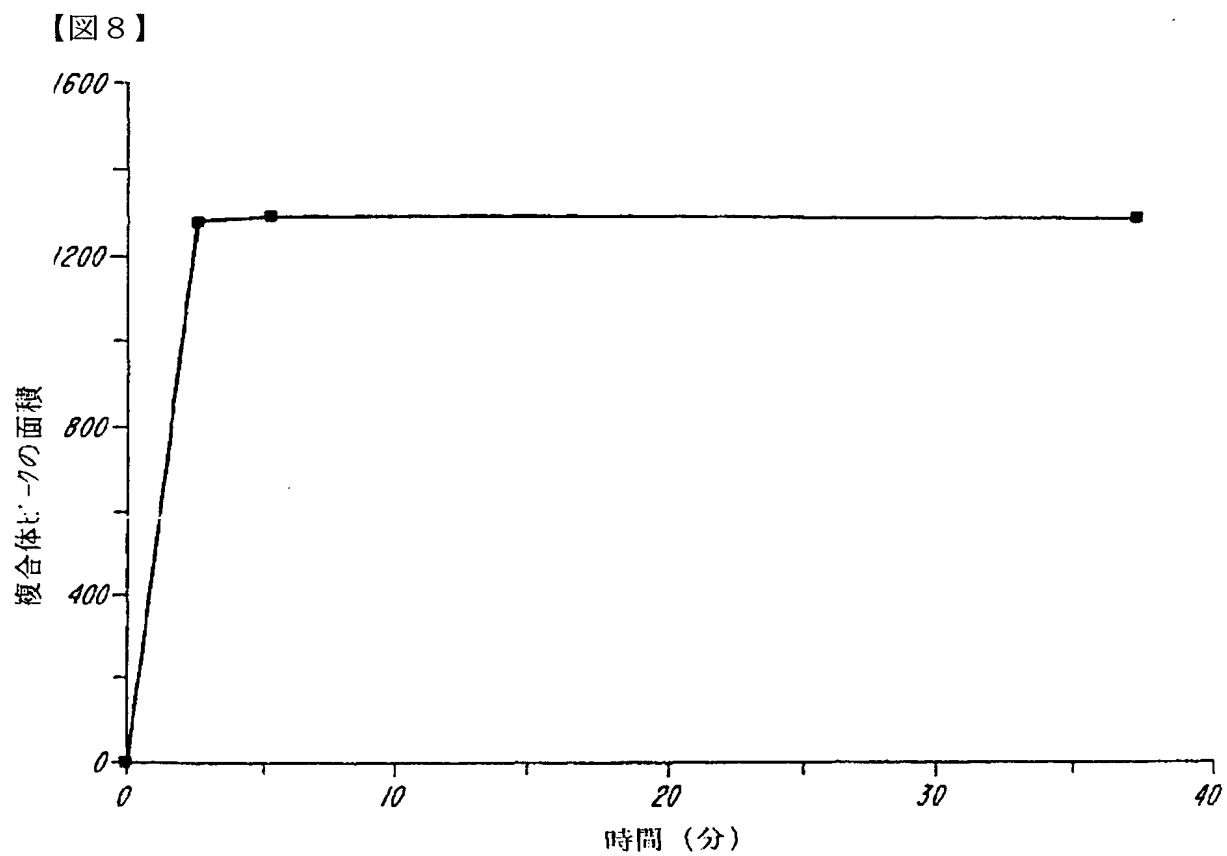


【図 6 B】

**FIG. 6B**

【図 7】

**FIG. 7**

**FIG. 8**

## 【国際調査報告】

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PCT/US 94/00426

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER IPC 5 G01N33/561 G01N33/533 G01N27/447 G01N33/563		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
B. FIELDS SEARCHED		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) IPC 5 G01N		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	US,A,4 942 136 (S.KONISHI ET AL.) 17 July 1990 see column 2, line 40 - column 3, line 68; claims ---	13,15,16
X	EP,A,0 254 172 (MILES LABORATORIES, INC.) 27 January 1988 see page 6, line 35 - page 7, line 21 ---	13,15
X	EP,A,0 339 302 (TEIJIN LIMITED) 2 November 1989 see page 4, line 45 - page 6, line 34 ---	13,15,16
Y	---	1-8, 10-13, 15,16, 18-20
	-/--	
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of box C. <input checked="" type="checkbox"/> Patent family members are listed in annex.		
* Special categories of cited documents : "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier document but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search  27 May 1994		Date of mailing of the international search report  06.05.94
Name and mailing address of the ISA European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2 NL - 2280 HV Rijswijk Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl, Fax (+31-70) 340-3016		Authorized officer  Hitchen, C

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.  
PC1/US 94/00426

C(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY vol. 539 , 1991 pages 177 - 185 R.G.NIELSEN ET AL. 'separation of antibody-antigen complexes by capillary zone electrophoresis, isoelectric focusing and high-performance size-exclusion chromatography' see the whole document ---	1-8, 10-13, 15,16, 18-20
Y,P	US,A,5 221 454 (B.S.MANIAN ET AL.) 22 June 1993  see column 1 - column 5 ---	1-8, 10-13, 15,16, 18-20
X,P	ANALYTICAL CHEMISTRY vol. 66, no. 1 , 1 January 1994 pages 9 - 15 K.SHIMURA ET AL. 'Affinity Probe capillary Electrophoresis: Analysis of Recombinant Human Growth Hormone with a Fluorescent Labeled Antibody Fragment' see the whole document ---	1-28
X,P	ANALYTICAL CHEMISTRY vol. 65, no. 21 , 1 November 1993 pages 3161 - 3165 N.M.SCHULTZ ET AL. 'Rapid Immunoassays Using Capillary Electrophoresis with Fluorescence Detection' see the whole document ---	21-28
A	WO,A,92 13229 (EUROPHOR S.A.) 6 August 1992  see page 3 - page 7 ---	1-8,11, 12,21, 22,25,26
A	JOURNAL OF CHROMATOGRAPHY vol. 608 , 1992 pages 3 - 12 F.FORET ET AL. 'On-column transient and coupled column isotachophoretic preconcentration of protein samples in capillary zone electrophoresis' see abstract ---	1,2,9-11
A	CYTOMETRY vol. 10 , 1989 pages 3 - 10 L.A.ERNST ET AL. 'cyanine dye Labeling Reagents for Sulfhydryl Groups' cited in the application see abstract -----	1,3-6

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/US 94/00426

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
US-A-4942136	17-07-90	JP-A- 1032170	02-02-89
EP-A-0254172	27-01-88	US-A- 4810638	07-03-89
		CA-A- 1293441	24-12-91
		DE-A- 3774348	12-12-91
		JP-B- 5035990	27-05-93
		JP-A- 63045561	26-02-88
EP-A-0339302	02-11-89	JP-A- 2183164	17-07-90
		JP-A- 1254700	11-10-89
		JP-A- 2173569	05-07-90
		AU-B- 629543	08-10-92
		AU-A- 3241889	05-10-89
		DE-D- 68911574	03-02-94
		DE-T- 68911574	11-05-94
		JP-A- 2291263	03-12-90
US-A-5221454	22-06-93	US-A- 5137609	11-08-92
		WO-A- 9315392	05-08-93
WO-A-9213229	06-08-92	FR-A- 2671407	10-07-92